

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 230 935 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

14.08.2002 Patentblatt 2002/33

(51) Int Cl.7: **A61K 47/48, A61K 9/00**

(21) Anmeldenummer: **02002754.6**

(22) Anmeldetag: **07.02.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **09.02.2001 DE 10105921**

(71) Anmelder: **B. BRAUN MELSUNGEN AG
34212 Melsungen (DE)**

(72) Erfinder:

- **Meier, Bernd H.
64285 Darmstadt (DE)**
- **Jankowiak-Meier, Iris
64285 Darmstadt (DE)**

(74) Vertreter: **Weber, Thomas, Dr. et al**

**Patentanwälte
von Kreisler-Seltling-Werner,
Deichmannhaus am Dom
50667 Köln (DE)**

(54) **Modifizierte Kolloide und deren Verwendung.**

(57) Die Erfindung betrifft an Kolloide gebundene Arzneiwirkstoffe, ein Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung zur direkten Injektion sowie Zellsuspensionen umfassend diese an Kolloide gebundenen Arzneiwirkstoffe in phagozytierter Form und deren Verwendung für den gezielten Arzneistofftransport an bestimmte Wirkorte des menschlichen und tierischen Kör-

pers. Die Erfindung betrifft ferner ein Kit-of-parts umfassend die Einzelbestandteile zur Herstellung der wässrigen pharmazeutischen Zusammensetzungen.

In einer weiteren Ausgestaltung betrifft die Erfindung durch Kolloide modifizierte Kolloide und deren Verwendung als Blutplasmaersatzmittel.

EP 1 230 935 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verbindungen, die erhältlich sind durch kovalente Anknüpfung von Wirkstoffen oder Gruppen, die sich von Kolloiden ableiten an ein kolloid-wirksames Primärmolekül, die Herstellung derartiger modifizierter Kolloide und deren Verwendung.

[0002] Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt an Kolloide gebundene Arzneiwirkstoffe, ein Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung zur direkten Injektion sowie Zellsuspensionen umfassend diese an Kolloide gebundenen Arzneiwirkstoffe in phagozytierter Form und deren Verwendung für den gezielten Arzneistofftransport an bestimmte Wirkorte des menschlichen und tierischen Körpers. Die Erfindung betrifft ferner ein Kit-of-parts umfassend die Einzelbestandteile zur Herstellung der wässrigen pharmazeutischen Zusammensetzungen.

[0003] In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung Verbindungen, die erhältlich sind durch chemische (kovalente) Anbindung von kolloidwirksamen Molekülen an ein kolloidwirksames Primärmolekül. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung diesen durch Kolloide modifizierten Kolloide und deren Verwendung als Blutplasmaersatzmittel.

[0004] Ein Arzneistoff, der in den Blutkreislauf des Körpers injiziert worden ist, wird mit dem zirkulierenden Blut in den Organen verteilt. In Abhängigkeit von der chemischen Stabilität des Arzneistoffs, seiner Löslichkeit, seiner Molekülgröße, und seiner Elimination entfaltet nur ein Bruchteil der ursprünglich eingebrachten Menge des Arzneistoffs am Wirkort die gewünschte Wirkung. Sehr oft wird ein großer Teil des Arzneistoffs metabolisiert und/oder eliminiert, bevor er überhaupt am Wirkort über einen hinreichend langen Zeitraum in einer relevanten Wirkkonzentration vorgelegen hat.

[0005] Demgegenüber zu stellen ist die gezielte Einführung von Arzneistoffen in spezielle Zellen, die unter dem Begriff "active targeting" zusammengefasst wird. Es ist bekannt, dass Chemotherapeutika gegen viszerale Leishmaniosen (z. B. Doxorubicin) speziell in Makrophagen (dem Wirt für Leishmanien) eingeführt werden, um die Erreger in ihren Wirtszellen abzutöten. Diese Phagozytose durch Makrophagen kann durch die Einbringung des Wirkstoffs in spezielle, mit äußeren Mannoseresesten versehenen Liposomen erreicht werden.

[0006] Es ist ferner bekannt, dass Granulozyten und Monozyten gezielt in die Region von Entzündungsherden einwandern und dort im Verbund mit anderen Granulozyten Kolonien bilden, also in einer höheren Dichte vorliegen. Diese Reaktion wird durch Chemokine (wie das Makrophagen-chemoaktive Peptid MCP-1) und andere Mediatoren (wie u. a. den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF)) gesteuert.

[0007] Es ist außerdem bekannt, dass Monozyten im Gegensatz zu anderen weißen Blutkörperchen eine hin-

reichend lange Lebensdauer von mehreren Monaten aufweisen. Als phagozytisches Zellsystem bezieht sich die Erfindung im wesentlichen auf im Blut zirkulierende Monozyten. Monozyten werden aus der Stammzellreihe im Knochenmark entwickelt. Die Zellen gelangen von dort in die Blutbahn, in der sie für einen Zeitraum von 20 - 30 Stunden zirkulieren. In dieser Phase reifen sie und entwickeln ausgeprägte immunologische Leistungen wie

- Phagozytose für Bakterien, Pilze, Parasiten (und Kolloide),
- Zytotoxizität für Parasiten, Tumorzellen, Viren,
- Sekretorische Leistungen wie
- Arachidonsäureabkömmlinge, Zytokine,
- Komplementkomponenten, insgesamt über 100 verschiedene Produkte, immunoregulatorische Funktionen.

[0008] Unter diesen Aufgaben kommt der Phagozytosefunktion eine bedeutende Rolle zu. Viele der zytotoxischen und sekretorischen Funktionen werden durch Phagozytose ausgelöst, wobei einige dieser Funktionen an der Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt werden können. Sehr komplexe immunologische Funktionen haben Monozyten bei der spezifischen zellulären Immunabwehr. Hierbei spielt die Interaktion mit dendritischen Zellen zur Antigenprozessierung mit T-Lymphozyten im Zusammenhang mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) eine wesentliche Rolle. Durch die Aufnahme in Makrophagen können die gewünschten Substanzen (als arzneilich wirksame Stoffe) direkt in lymphatische Organe eingeschleust und dort beispielsweise als Antigen präsentiert werden.

[0009] In der Peripherie des RHS wandern bei Entzündungen im Blut zirkulierende Monozyten verstärkt in den Entzündungsherd ein. Diese zielgerichtete Einwanderung wird durch die im vorigen genannten Mediatoren ausgelöst und unterhalten.

[0010] Kolloidale Stärkeverbindungen werden als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt. Der kolloidale Bestandteil dieser Infusionslösungen dient dabei dem Aufbau bzw. der Erhaltung eines intravasalen kolloidosmotischen Druckes. Der im gesunden Menschen wirkende intravasale kolloidosmotische Druck verhindert ein Ausströmen des Wassers in die die Gefäße umgebenden Bindegewebsräume. Beim gesunden Menschen wird der kolloidosmotische Druck durch die Summe aller kolloidosmotisch wirkenden Plasmapbestandteile, im wesentlichen durch das Albumin, aufrechterhalten. Durch Blutverlust oder Synthesestörungen kann der Albumingehalt des Blutes und damit der intravasale kolloidosmotische Druck so kritisch absinken, dass es zu einem

massiven Ausströmen von Wasser mit den darin gelösten Elektrolyten in das Bindegewebe kommt. Auf der anderen Seite fehlt dieses Volumen im Kreislauf. Die Folge sind Durchblutungs- und Kreislaufstörungen bis hin zum Schock.

[0011] Die Stärke ist ein im Pflanzenreich weitverbreitetes Polymer und macht einen wesentlichen Bestandteil unserer täglichen Nahrung aus. Wenn Stärkemoleküle durch Einführung von Substituenten in eine wasserlösliche Struktur überführt werden, kann mit ihnen in wässriger Lösung ein kolloidosmotischer Druck aufgebaut werden. Nach Infusion einer Hydroxyethylstärke hinreichend großen Molekulargewichts wirkt im Gefäßsystem ein kolloidosmotischer Druck. So werden z.B. in der modernen Notfallmedizin Hydroxyethylstärkeinfusionen zur Behandlung akuter Blutverluste mit guter Wirkung eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Substitutionsverfahren, wie Carboxymethylierung und Acetylierung hat sich die Hydroxyethylierung aufgrund der niedrigen Unverträglichkeitsprobleme und der Stabilität der Ätherverbindung weitgehend durchgesetzt. Zusätzlich kann durch Hydroxyethylstärke die Blutviskosität günstig beeinflusst werden. Die stabilen Ätherbindungen der Hydroxyethylgruppen behindern weitgehend den enzymatischen Abbau des Stärkemoleküls und sind damit entscheidend für die Plasmahalbwertszeit des Blutersatzstoffes. Die Stabilität der Hydroxyethylstärke ermöglicht aber auch die Phagozytose und Aufnahme von HES in Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES). Hier sind insbesondere nach wiederholter Infusion des Blutplasmaersatzstoffes relevante Speicherphänomene beobachtet worden. Diese Speicherung im Retikuloendothelialen System schränkt die Anwendung zum Beispiel von Hydroxyethylstärke deutlich ein. Bisher hat man versucht, durch Modifikation des Substitutionsgrades (DS) und dem Substitutionsort (C2-C6 Atom der Glucosemonomereinheit) Elimination und Speicherung der Hydroxyethylstärke günstig zu beeinflussen. Aber auch nach diesen Veränderungen ließ sich nach Infusion gespeicherte Hydroxyethylstärke (HES) in den Zellen des Retikuloendothelialen Systems nachweisen. Die vorliegenden Studien lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass hochsubstituierte Hydroxyethylstärkelösungen stark gespeichert werden und gute andauernde Volumeneffekte aufweisen, demgegenüber werden niedrig substituierte Hydroxyethylstärkelösungen wenig gespeichert und haben einen entsprechend geringen Volumeneffekt.

[0012] Grundsätzlich hängt die Plasmaverweildauer infundierter Hydroxyethylstärke vom Substitutionsgrad ab. Je höher der DS einer Hydroxyethylstärke, umso langsamer wird diese abgebaut, d.h. umso länger kann sie im Serum nachgewiesen werden. Entsprechend niedrig ist die Abbaumöglichkeit für den Organismus, wobei die Speicherung der Hydroxyethylstärke im RES zunimmt. Bei der Optimierung des Blutplasmaersatzstoffs durch die Modifikation von Substitutionsgrad DS schließen sich eine gute Verweildauer im Blut und eine

geringe Organspeicherung weitgehend aus.

[0013] Dementsprechend war es eine erste Aufgabe der Erfindung, eine Verbindung zur Verfügung zu stellen, die einen Arzneimittelwirkstoff enthält und diesen Wirkstoff durch Makrophagen in spezifischen Organen des menschlichen und tierischen Körpers zur Wirkung gebracht werden kann.

[0014] Es war eine zweite Aufgabe der Erfindung, ein Plasmaersatzmittel zur Verfügung zu stellen, das einen gewünschten kolloidosmotischen Effekt hat, ohne dabei gespeichert zu werden. Erfindungsgemäß sollte also eine Hydroxyethylstärke bereitgestellt werden, die:

1. kolloidosmotisch wirksam ist,
2. eine gute Wasserlöslichkeit besitzt,
3. die Blutviskosität verbessert,
4. hinreichend lange im Blut verbleibt,
5. ohne Speicherung vollständig ausgeschieden wird.

[0015] Die vorliegende Erfindung dient gemäß dem ersten Aspekt der Anreicherung von arzneilich wirksamen Stoffen in Makrophagen und damit in Zellen und Organen des Retikuloendothelialen Systems. Durch Injektion dieser Makrophagen können ebenfalls Bereiche erreicht werden, die Ziel der Migration von zirkulierenden Makrophagen und weißen Blutkörperchen sind.

[0016] Durch die Aufnahme der erfindungsgemäßen Verbindungen in Makrophagen werden Arzneistoffe in spezifischen Organen eines Patienten zur Wirkung gebracht. Dieser Vorgang wird als "drug targeting to macrophages" bezeichnet. Das setzt voraus, dass der arzneilich wirksame Bestandteil oder Stoff unter der drug targeting Prozedur seine arzneiliche Wirkung behält. Deshalb sollte sich der Arzneistoff idealerweise nach Phagozytose, d.h., Aufnahme in spezifische Vesikel des Makrophagen wieder vom Kolloid lösen, jedoch in den Vesikeln verbleiben, bis die Zellen den gewünschten Zielort erreicht haben. Irreversible Bindungen zwischen Arzneistoff Z und Kolloid X sind deshalb in der Regel nicht sinnvoll.

[0017] Für die klinisch befriedigende Anwendung von "drug targeting" Prozeduren mit patienteneigenen Zellen müssen einige Bedingungen erfüllt sein:

1. Das Verfahren sollte einfach und schnell am Patienten ohne Vitalitätsverlust der Zellen (z. B. durch Versand in entsprechende Zentren) durchgeführt werden können.
2. Alle Prozeduren müssen unter sterilen Bedingungen, ohne Verunreinigungen insbesondere Pyrogene durchgeführt werden.

3. Nach Inkubation des entnommenen Patientenblutes mit dem gewünschten Arzneistoff sollte es zu einer befriedigenden Aufnahme oder Phagozytose des arzneilich wirksamen Stoffs in die Makrophagen führen.

4. Nach Phagozytose sollte eine Separation der betreffenden Zellen sowie eine Entfernung von nicht aufgenommenen Substraten erfolgen.

5. Die Phagozytose des Substrats sollte einfach quantifiziert und überprüft werden können.

6. Es sollte eine sofort reinfundierbare Zellsuspension hergestellt werden.

7. Das Schicksal einer reinfundierten Zellsuspension sollte sowohl im peripheren Blut als auch in Gewebeproben und im Urin verfolgt werden können (Eliminationszeiten).

8. Die Vorbereitung des Wirkstoffs zur Phagozytose sollte nicht mit einem Verlust der gewünschten Wirkung einhergehen.

[0018] Im Idealfall wird der arzneilich wirksame Stoff nach Phagozytose durch den Makrophagen wieder vom Kolloid abgespalten.

[0019] Durch Inkubationsversuche konnte am Blut festgestellt werden, dass die Phagozytosekapazität für Kolloide starken Schwankungen unterliegt. Deshalb müsste für die individuelle Optimierung des Verfahrens die Messung der Aufnahme kolloidal gebundener arzneilich wirksamer Stoffe verlangt werden.

[0020] Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass durch Phagozytose eine Vielzahl von Substraten aufgenommen wird. Auftrennungen der Zellfraktionen und Cluster durch Gradientensedimentation mit anderen Kolloiden führten zu einer nur schwer abschätzbaren und unerwünschten Phagozytose der Sedimentationsmedien selbst. Darüber hinaus erschwert die Mischung, Separation, Zentrifugation und Dialyse der Zellen mit verschiedenen Lösungen und Medien eine sterile und pyrogenfreie Probenvorbereitung erheblich.

[0021] Die Erfindung basiert insbesondere auf Beobachtungen an Makrophagen, die Kolloide aufgenommen haben. Makrophagen bereiten u.a. Antigene enzymatisch für die Präsentation an spezifische Immunkompetente Zellen vor, d.h., die Enzymaktivitäten, Mechanismen der Antigenpräsentation und Transportvorgänge von Makrophagen sind aufeinander abgestimmt. Für die Erfindung relevant ist dabei auf der einen Seite, dass das Enzyminventar von Makrophagen eine sehr hohe Aktivität, z. B. Esterasen, aufweist und auf der anderen Seite kolloidosmotische Wirkungen in solchen makrozytären Zellorganellen bestehen, die Kolloide aufgenommen haben.

[0022] Erfindungsgemäß werden die Zellen deshalb

inkubiert mit Arzneistoff-Kolloid-Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei

- X eine kolloidwirksame Verbindung,
- Z ein Arzneimittelwirkstoff,
- L einen Linker, durch den X mit Z kovalent verknüpft ist,
- M ein Fluoreszenzmarker,
- m eine ganze Zahl zwischen 1 und 1.000.000, vorzugsweise 10 und 100.000, besonders bevorzugt 100 und 10.000 und
- n 0 oder 1 ist.

[0023] Im Gegensatz zur Verwendung des isolierten Arzneistoffs Z wurden diese erfindungsgemäßen Verbindungen verstärkt mittels Phagozytose durch Makrophagen aufgenommen.

[0024] In der Arzneistoff-Kolloid-Verbindung $M_n-X-(L-Z)_m$ ist der Arzneistoff Z kovalent über eine Linker-Gruppe (L) an die kolloidwirksame Verbindung X geknüpft. Vorzugsweise ist die kovalente chemische Bindung von X an Z über den Linker L reversibel, also ohne weiteres, beispielsweise enzymatisch, wieder spaltbar, wodurch es zur Freisetzung des Arzneiwirkstoffes Z kommt. Geeignete reversible Linker sind vor allem Esterbindungen, die durch die Esteraseaktivität der Makrophagen nach der Phagozytose wieder gespalten werden können. Alternativ können auch Urethan- oder Carbonsäureamid-Gruppen als Linker fungieren. Zur Bildung des Linkers weisen der Arzneistoff Z und das Kolloid X komplementäre, zur Reaktion miteinander geeignete funktionelle Gruppen auf.

[0025] Durch eine geeignete Wahl des mittleren Molekulargewichts des Kolloids können die notwendigen Bedingungen für eine Gradientensedimentation deutlich verbessert werden. Gleichzeitig kann die Arzneistoff-Kolloid-Verbindung $M_n-X-(L-Z)_m$ auch als Träger von Markierungsmerkmalen M dienen, wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin, Rhodamid. Bevorzugt findet Fluoresceinisothiocyanat Verwendung.

[0026] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Hydrophilisierung von an sich hydrophoben Arzneiwirkstoffen (Z) durch die Bindung an ein hydrophiles Kolloid unter Bildung der erfindungsgemäßen Verbindung $M_n-X-(L-Z)_m$, entsprechend der obigen Definitionen. Die Herstellung kann wie unten beschrieben erfolgen. Eine

solche Wirkstoff-Anbindung an Kolloide ermöglicht die schmerzfreie direkte Injektion von lipophilen Wirkstoffen, wie z. B. Propofol, in wässrigen Lösungen ohne vorhergehende (ex-vivo) Phagozytose.

[0027] Erfindungsgemäß werden die Molekulargewichte und Größen so gewählt, dass sie die bei der Reinigung der aufgetrennten Zellsuspensionen durchströmten Dialysemembranen permeieren können. Bei Versuchen konnte festgestellt werden, dass durch dieses Verfahren eine schnelle und befriedigende Trennung der Zellen durch Zentrifugation erfolgen kann und gleichzeitig die Aufnahme der kolloidalen Makromoleküle $M_n-X-(L-Z)_m$ in die Monocyten und Makrophagen erfolgt.

[0028] Ein geeignetes Arzneistoff-Kolloid weist vorzugsweise ein mittleres Molekulargewicht von 20.000 bis 1.200.000 Dalton, bevorzugt 85.000 bis 750.000 Dalton, ganz besonders bevorzugt 100.000 bis 500.000 Dalton auf und liegt in Lösung in einer Konzentration von 0,1 bis 20 Gew.-%, vorzugsweise von 1 bis 15 Gew.-%, besonders bevorzugt von 3 bis 10 Gew.-% vor. Als Elektrolyte können Natrium und Chlorid in einer Konzentration von jeweils 100 bis 154 mmol/l vorliegen. Zur Optimierung der pH-Bedingungen kann die Lösung mit einem Puffer vorteilhaft auf der Basis von Histidinhydrochlorid in gewünschter Weise eingestellt werden. Zusätzlich kann ein Teil der Ionen durch Glucose und/oder Lactat als Nährstoff ersetzt werden.

[0029] Dass der Erfindung zugrunde liegende Prinzip, nutzt die Aufnahme- und Transportfähigkeit von Makrophagen für Kolloide. Durch chemische Bindung L wird ein arzneilich wirksamer Stoff Z an ein Kolloid X gebunden. In vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung werden die Arzneistoffe Z durch Esterbindungen L an das Kolloid X gebunden. Als Kolloid X kommen hierbei in erster Linie Kohlenhydrate, bevorzugt Polysaccharide wie Stärke oder deren markierte, insbesondere fluoreszenzmarkierte Derivate, vorzugsweise FITC-markierte Stärke, Hydroxyethylstärke, FITC-markierte Hydroxyethylstärke, Dextran, FITC-markiertes Dextran, Carboxymethylstärke (FITC-markierte Carboxymethylstärke) und Amylopektin in Frage. In einer Ausgestaltung kann die Gruppe X ausgewählt sein aus der Gruppe der Hydroxyethylstärken ("HES", "Polyhydroxyethylstärken") mit einem mittleren Molekulargewicht M_w von >100.000, vorzugsweise >150.000 bis zu 500.000, vorzugsweise bis zu 450.000. Der Substitutionsgrad DS beträgt dabei <0,6 und vorzugsweise <0,4.

[0030] Alternativ können jedoch auch andere Kolloide umfassend Peptide, z.B. Proteine, Gelatine, Oxypolygelatine, Oligopeptide und Polypeptide und Kombinationen der genannten Kolloide verwendet werden. Geeignete Kolloide und/oder Kolloidgemische weisen ein Molekulargewicht von 20.000 bis 800.000 Dalton, bevorzugt 80.000 bis 600.000 Dalton, besonders bevorzugt 100.000 bis 500.000 Dalton auf.

[0031] Vorteilhaft können weitere spezielle Reste in die Kolloide mit eingeführt werden, die eine chemische

Einbindung der arzneilich wirksamen Substanz erlauben, zum Beispiel Biotin, Aminosäuren oder Sulfidgruppen tragende Reste, wie Cystein.

[0032] Als Arzneistoffe Z kommen alle Substanzen in Frage, die über einen Linker L an die oben genannten Kolloide kovalent eingebunden werden können, also eine funktionelle Gruppe aufweisen, die unter Bildung des Linkers L mit einer komplementären funktionellen Gruppe des Kolloids reagieren können. Besonders bevorzugt sind dabei Arzneiwirkstoffe, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antibiotika, Chemotherapeutika, Cytostatika, Antigenen, Oligonucleotiden, Mediatoren, falschen Stoffwechselsubstraten und cytotoxischen Substanzen. Diese Arzneiwirkstoffe werden kovalent an das Kolloid gebunden und makrozytär aufgenommen.

[0033] Die als Linker L vorzugsweise fungierende Esterbindung erweist sich dabei in Abhängigkeit von der chemischen Struktur und Polarität der Arzneistoffreste als unterschiedlich stabil. Von herausragender Bedeutung für die Stabilität der Esterbindungen sind die Eigenschaften bzw. das enzymatische Potential der Zellen und Zellorganellen, in die die Arzneistoff-Kolloid-Verbindungen $M_n-X-(L-Z)_m$ aufgenommen werden. Die Stabilität der durch Phagozytose erreichten Verteilung kann durch die Einführung weiterer auch unterschiedlicher Substituenten verstärkt werden. Dieser Effekt kann auf im wesentlichen zwei gleichsinnig wirkende Mechanismen zurückgeführt werden:

I. Die Esterbindung zwischen Arzneistoff und Kolloid wird chemisch stabilisiert.

II. Durch die in die Zellorganellen und Zellen aufgenommene Kolloide wird ein kolloidosmotischer Druckgradient aufgebaut, der den nach Verseifung freien Arzneistoff in dem betroffenen Kompartiment zurückhält. Durch eine Erhöhung der Substitution wird die enzymatische Degradation beispielsweise eines Stärkemoleküls wesentlich aufgehalten und damit ein höherer kolloidosmotischer Effekt bewahrt.

[0034] Beide Mechanismen müssen durch eine höhere Substitution mit esterastabilen Substituenten entsprechend verstärkt werden.

[0035] Im Fall der Verwendung von Carboxymethylgruppen bieten sich weitere Vorteile, weil die in die Esterbindung eingehende Carboxylgruppe von seiten des Kolloids gestellt wird und von dem Arzneistoff lediglich eine Hydroxylgruppe zur Verfügung gestellt werden muss. Zur Modifikation der Phagozytose- und Hydratationseigenschaften kann eine zusätzliche Substitution mit Hydroxyethylgruppen erfolgen.

[0036] Neben den Estern stellen Carbonsäureamide und Urethane eine alternative Ausgestaltung des Linkers L zur Anbindung des Arzneiwirkstoffes Z an das Kolloid X dar.

[0037] Weist das Kolloid X mehrere funktionelle Gruppen auf (gekennzeichnet durch $m > 1$), so können mehrere Wirkstoffmoleküle Z am Kolloid angebunden werden. Dabei muss es sich keineswegs um identische Wirkstoffmoleküle handeln.

[0038] In einer besonderen Ausgestaltung der Erfindung werden unterschiedliche Wirkstoffmoleküle Z_1-Z_n über unterschiedliche Linker L_1-L_p an ein Kolloid X angebunden. Aufgrund unterschiedlicher Hydrolysegeschwindigkeiten k_1-k_p der einzelnen Linker L_1-L_p kann eine zeitverzögerte Freisetzung der einzelnen Wirkstoffe Z_1-Z_p erfolgen.

[0039] Die Bildung des Linkers L kann mit Hilfe der im Stand der Technik beschriebenen Methoden zur Bildung von Carbonsäureestern, -amiden und Urethanen erfolgen.

[0040] Ausgehend von einem zugrundegelegten, Hydroxyl-Gruppen (OH-) tragenden Kolloid X, kann die Bildung der Linker L mit Arzneiwirkstoffen Z erfolgen, die Funktionalitäten besitzen, welche ausgewählt sind aus

- Isocyanat- (-NCO)
- Carboxyl- (-COOH),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-X, mit X = Cl, Br, I)
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- oder Ester-Gruppen (-COOR).

[0041] Umgekehrt können zugrundegelegte, Hydroxyl-Gruppen (OH-) tragende Arzneiwirkstoffe Z, den Linker L mit Kolloiden X bilden, die Funktionalitäten besitzen, welche ausgewählt sind aus

- Isocyanat- (-NCO)
- Carboxyl- (-COOH),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br, I)
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- oder Ester-Gruppen (-COOR).

[0042] Ausgehend von einem zugrundegelegten, Amino-Gruppen (-NH₂) tragenden Kolloid X, kann die Bildung der Linker L mit Arzneiwirkstoffen Z erfolgen, die Funktionalitäten besitzen, welche ausgewählt sind aus

- Carboxyl- (-COOH),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br, I)
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- oder Ester-Gruppen (-COOR).

[0043] Umgekehrt können zugrundegelegte, Amino-Gruppen (-NH₂) tragende Arzneiwirkstoffe Z den Linker L mit Kolloiden X bilden, die Funktionalitäten besitzen, welche ausgewählt sind aus

- Carboxyl- (-COOH),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br, I)
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- oder Ester-Gruppen (-COOR).

[0044] Die jeweils in den Ester-Gruppen auftretende Gruppe R ist eine Kohlenwasserstoff-Gruppe mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen.

[0045] Alternativ ist die erfindungsgemäße Verbindung auch erhältlich durch Reaktion wenigstens einer freien

- Hydroxyl- (-OH) oder
- Amino-Gruppe (-NH₂)

des zugrundeliegenden Kolloids X, mit einer freien

- Carboxyl- (-COOH),
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br oder I)
- oder Ester-Gruppe (-COOR)

des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z, unter Bildung des Linkers L.

[0046] In einer weiteren Ausgestaltungsform der Erfindung können zusätzliche, bi-, tri- oder polyfunktionelle Moleküle zur Bildung der Linker eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um Verbindungen der allgemeinen Formel



wobei s eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, R¹ ausgewählt ist aus

- einer Einfachbindung;
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 1 bis 22, vorzugsweise 2 bis 15, besonders bevorzugt 3 bis 8 Kohlenstoffatomen;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₄-Alkyl- und Aryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 5 bis 12, vorzugsweise 6 bis 12, besonders bevorzugt 6 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen; oder
- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₄-Alkyl- und Heteroaryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen,

und die Reste Y₁ bis Y_s funktionellen Gruppen sind, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus

- Hydroxyl- (-OH)
- Amino- (-NH₂)

- Carboxyl- (-COOH),
- Isocyanat- (-NCO),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br oder I)
- Carboxylalkylen- $-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$
- oder Ester-Gruppen (-COOR).

[0047] Bei diesen Verbindungen handelt es sich bevorzugt um trifunktionale Moleküle mit $Y_1 = Y_2 = Y_3$, besonders bevorzugt jedoch um bifunktionale Moleküle bei denen Y_1 und Y_2 identisch sind.

[0048] Solche Verbindungen sind z.B.

- Dicarbonsäuren, wie Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Pimelinsäure, Azelainsäure, Sebacinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Sorbinsäure, Phthalsäure, Terephthalsäure, Isophthalsäure, Agaricinsäure, Citronensäure, sowie deren C_1-C_{10} -Alkylester, Halogenide, und Anhydride,

- Diisocyanate, wie z.B. Toluylendiisocyanat, Bitoluylendiisocyanat, Dianisidindiisocyanat, Tetramethylenendiisocyanat, Hexamethylenendiisocyanat, m-Phenylendiisocyanat, m-Xylylendiisocyanat, C_1-C_8 Alkylbenzoldiisocyanat, 1-Chlorbenzol-2,4-diisocyanat, Cyclohexylmethandiisocyanat, 3,3'-Dimethoxydiphenylmethan-4,4'-diisocyanat, 1-Nitrobenzol-2,4-diisocyanat, 1-Alkoxybenzol-2,4-diisocyanat, Ethylendiisocyanat, Propylendiisocyanat, Cyclohexylen-1,2-diisocyanat, 3,3'-Dichloro-4,4'-biphenylendiisocyanat, Diphenylendiisocyanat, 2-Chlorotrimethylenendiisocyanat, Butylen-1,2-diisocyanat, Ethylendiisocyanat, Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, Diphenylethandiisocyanat, 1,5-Naphthalindiisocyanat, Cyclohexandiisocyanat und Isophorondiisocyanat,

- Diöle, wie z.B. Ethylenglycol, Propylenglycol, Butylenglycol, und Neopentylglycol, Pentandiol-1,5,3-Methylpentandiol-1,5, Bisphenol A, 1,2- oder 1,4-Cyclohexandiol, Caprolactondiol (Reaktionsprodukt aus Caprolacton und Ethylenglycol), hydroxyalkylierte Bisphenole, Trimethylolpropan, Trimethylolpropan, Pentaerythritol, Hexandiol-1,8, Heptandiol-1,7, Octandiol-1,8, Butandiol-1,4, 2-Methyloctandiol-1,8, Nonandiol-1,9, Decandiol-1,10, Cyclohexandimethylol, Di-, Tri- und Tetraethylenglykol, Di-, Tri- und Tetrapropylenglykol, Polyethylen- und Polypropylenglykole mit einem mittleren Molekulargewicht von 150 bis 15.000, Trimethylethan, Trimethylolpropan und Pentaerythrit,

- Diamine, wie z.B. 1,2-Diaminoethan, 1,2- oder 1,3-Diaminopropan, 1,2-, 1,3- oder 1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, 2,2-Dimethyl-1,3-diaminopropan, Hexamethylenediamin, 1,7-Diaminoheptan, 1,8-Diaminooctan, Trimethyl-1,8-diaminohexan,

1,9-Diaminononan, 1,10-Diaminodecan, 1,12-Diaminododecan, 1,2-Diaminocyclohexan, 1,4-Diaminocyclohexan, 1,3-Cyclohexanbis(methylamin), 1,2-Phenylendiamin, 1,3-Phenylendiamin, 1,4-Phenylendiamin, 4,4'-Ethylendianilin, 4,4'-Methylenedianilin, 4,4'-Diaminostilben, 4,4'-Thiodianilin, 4-Aminophenyldisulfid, 2,6-Diaminopyridin, 2,3-Diaminopyridin, 3,4-Diaminopyridin, 2,4-Diaminopyrimidin, 4,5-Diaminopyrimidin, 4,6-Diaminopyrimidin.

[0049] Die Verwendung solcher Linker-Moleküle ermöglicht die Kombination von Kolloiden X mit Wirkstoffen Z, die identische funktionelle Gruppen tragen, z.B. zweier Alkohole, und folglich nicht direkt unter Bildung eines Linkers L miteinander reagieren können.

[0050] Zur Durchführung des Verfahrens wird menschliches oder tierisches Blut nach der Entnahme mit einer wässrigen Zusammensetzung umfassend die Verbindung $M_n-X-(L-Z)_m$ versetzt. Eine solche Zusammensetzung enthält die Verbindung $M_n-X-(L-Z)_m$ in einer Konzentration von 0,0001 bis 50 Gew.-%, bevorzugt von 0,0005 bis 10 Gew.-%, besonders bevorzugt von 0,001 bis 1 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtzusammensetzung. Die pharmazeutische Zusammensetzung ist direkt injizierbar.

[0051] Aufgrund der Eigenschaft von Makrophagen, Makromoleküle, insbesondere Kolloide, zu phagozytieren, werden die Kolloid-Arzneistoff-Komplexe $M_n-X-(L-Z)_m$ von diesen aufgenommen. Gleichzeitig oder im Anschluss werden die Blutzellfraktionen in der Kolloid-Arzneistoff-Komplex-Lösung durch Zentrifugation aufgetrennt und abgehoben. Durch ein Dialyseverfahren werden danach die nicht phagozytierten Kolloid-Arzneistoff-Komplexe aus der Zellsuspension gewaschen. Da in den Kolloid-Anteil des Kolloid-Arzneistoff-Komplexes Fluoreszenz-Marker eingebaut sein können, kann das Maß der Aufnahme der Kolloid-Arzneistoff-Komplexe mittels Durchflussszytometrie quantifiziert werden. Schließlich kann die Zellsuspension infundiert werden. Die Zellen des Blutes sind ausgewählt aus der Gruppe der Makrophagen, Phagozyten, Monozyten, Histiozyten, Osteoklasten, Kupfer-Zellen, Granulozyten und Mikroglia-Zellen.

[0052] In einem Anwendungsbeispiel soll einem Patienten ein arzneilich wirksamer Stoff zur Behandlung einer Erkrankung im Bereich der lymphatischen Organe zugeführt werden. Für den arzneilich wirksamen Stoff soll dabei eine erhöhte Konzentration im Bereich der peripheren Lymphknoten erreicht werden. Hierfür wird dem Patienten Vollblut entnommen und mit der Arzneistoff-Kolloid-Verbindung in einem Zentrifugenröhrchen inkubiert. Um spezifische Interaktionen zwischen den immunkompetenten Zellen (nach Inkubation) in der Blutprobe zu verhindern, kann es notwendig werden, bestimmte Cluster dieser Zellen zu entfernen. Dies kann durch Adhäsion an geeignete Oberflächen erfolgen. Andere geeignete Verfahren sind die Gradientensedimen-

tation. In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens wird das Patientenblut mit der Arzneistoff-Kolloid-Verbindung inkubiert und bei geeigneter Wahl von Molekulargewicht und chemischer Struktur des Kolloids (z. B. Dextran/Stärke) in diesem Medium zentrifugiert. Die Arzneistoff-Kolloid-Lösung dient dabei sowohl als Medium für die Gradientensedimentation, als auch Phagozytose-Substrat der Zellsuspension.

[0053] Es konnte festgestellt werden, dass durch dieses Verfahren eine schnelle und befriedigende Trennung der Zellen durch Zentrifugation erfolgen kann und gleichzeitig die Aufnahme der kolloidalen Makromoleküle in die Makrophagen erfolgt.

[0054] Je nachdem ob ein Einfluss auf die zellulären Heparin-Bindungsstellen für Chemokine gewünscht wird, kann die Vollblut-Arzneistoff-Suspension durch Heparin und/oder durch andere Verfahren, beispielsweise durch Zusatz von Natriumcitrat ungerinnbar gemacht werden. Danach wird das Blut durch entsprechende Dialyse und/oder Filtrationsverfahren von den nicht durch Phagozytose zellulär aufgenommenen Arzneistoff-Kolloid-Makromolekülen gereinigt.

[0055] Dementsprechend wird nach der Inkubation wird die Suspension bestehend aus Blut und der Arzneistoff-Kolloid-Lösung zentrifugiert. Hierdurch werden die roten von den weißen Blutkörperchen und verbliebenen Thrombozyten getrennt. Die Leukozyten befinden sich nach Zentrifugation in einer spezifischen Schicht des Gradientenmediums und können, im einfachsten Fall, beispielsweise mit einer Pipette abgehoben werden. In einer anderen Ausgestaltung kann diese Zellschicht durch vorgefertigte Öffnungen in der Wand des Inkubations- und Zentrifugenröhrchens zum Abströmen gebracht und gesammelt werden. Danach wird die so separierte Leukozytenfraktion durch Dialyse von den nicht phagozytierten Arzneistoff-Kolloid-Molekülen befreit. Hierbei wird die Blut/Arzneistoff-Kolloid-Lösungssuspension von einer Dialyselösung durchströmt, die dabei eine Dialysemembran passiert. Dabei treten alle gelösten Bestandteile durch die Dialysemembran, die Leukozyten jedoch werden durch die Membran zurückgehalten und verbleiben in einem Rest der Dialyselösung, die danach aufgrund ihrer entsprechenden Zusammensetzung als Nähr- und Pufferlösung dient.

[0056] In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens kann die gewünschte Phagozytose der Arzneistoff-Kolloid-Komplexe beobachtet und quantifiziert werden. Eine Markierung des Kolloids durch einen Fluoreszenzmarker M, beispielsweise durch Fluoresceinisothiocyanat ermöglicht es, die Phagocytose des markierten Arzneistoff-Kolloid-Komplexes durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren zu erfassen. Dies kann nach Entnahme aus einer abgeschlossenen Kontrollkammer geschehen. Diese Messungen sollten nach Reinigung von den nicht phagozytierten Arzneistoff-Kolloid-Komplexen in geeigneten Messkammern erfolgen. Abschließend kann das hergestellte Zellsuspensat dem Patienten infundiert werden.

[0057] Die Phagozytose-Erfassung und Quantifizierung kann aber auch kontinuierlich mittels Durchflusssytopmetrie in den entsprechend vorbereiteten Proben erfolgen. Bei Bedarf kann sogar die Durchflusssytopmetrie mit Zellsortern betrieben und die Zellen mit aufgenommenen fluoreszierendem Arzneistoff-Kolloid-Komplex separiert werden. Durch Sorterverfahren kann die Spezifität der injizierbaren Zellsuspensionen gesteigert werden, dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwendig und damit mit einer niedrigeren Ausbeute an injizierbaren Zellen verbunden.

[0058] In einer weiteren Ausgestaltung betrifft die Erfindung ein Kits-of-Parts, umfassend die Fertiglösungen umfassend die erfindungsgemäße Verbindung I in wässriger Lösung, gegebenenfalls in Mehrkammersystemen umfassend Separations- und Dialyskammern und geeignete Mittel zur Regelung der Flüsse zwischen den Kammern.

[0059] In einer besonderen Ausgestaltung besteht ein solcher Kit-of-Parts aus

- mindestens einer Arzneistoff-Kolloid-Lösung;
- mindestens einem zur Zentrifugation geeigneten Gefäß;
- einer Pipettier oder Abflussvorrichtung für die separierte Zellfraktion;
- einem gerinnungshemmenden Stoff;
- einem Behälter für die Dialysat-Puffer-Lösung
- einer Dialyse-Kammer, die von einer Membran unterteilt ist, welche für die angewendeten Flüssigkeiten durchlässig ist, die Zellen jedoch zurückhält.

[0060] In einer weiteren besonderen Ausgestaltung sind alle Lösungen und Medien in einem Mehrkammersystem integriert, in welchem die Medien durch Kanäle und/oder Schläuche miteinander verbunden sind, deren Durchgängigkeit von außen gesteuert und kontrolliert werden kann. In der Wand des zur Phagozytose und Gradientensedimentation vorgesehenen Gefäßes befinden sich Auslassöffnungen und Kanäle, die durch Abdeckflächen verschlossen sind. Durch die Bewegung der Abdeckfläche kann ein Teil einer Auslassöffnung geöffnet werden. In einer alternativen Ausgestaltung befinden sich die Auslässe in einem inneren Gefäß, das durch Abdeckmittel eines äußeren Gefäßes verschlossen wird. Durch eine relative Verschiebung der beiden Gefäße gegeneinander kann eine mindestens teilweise Öffnung von einem der Auslässe erreicht werden.

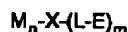
[0061] Da die Zentrifugation ein wesentlicher Mechanismus der Zellseparation ist, ist der komplette Kit-of-Parts vorzugsweise geeignet, nach der Blutentnahme und Trennung vom Patienten in einen speziellen Zentrifugenrotor eingefügt zu werden. Durch diese Anord-

nung ist sichergestellt, dass das Mehrkammer-System lediglich bei der Inkubation mit Patientenblut sowie bei der Retransfusion (nach Phagozytose, Separation und Dialyse im geschlossenen System) mit der Außenwelt in Kontakt gebracht wird.

[0062] Die Phagozytose erfolgt hierbei in einem Röhrchen, das in die Zentrifuge eingesetzt werden kann. Das Röhrchen kann bereits während des Phagozytosevorgangs mit wählbaren und veränderbaren Drehzahlen und Temperaturen zentrifugiert werden. Lediglich am Ende der Gradientenseparation sollten die Leukozyten, insbesondere Monozyten, in einer spezifischen Zellschicht vorliegen. Diese Zellschicht kann einerseits bei einem Kit-of-Part durch eine vorinstallierte Pipetivorrichtung abgehoben werden. Zum anderen ist es vorteilhaft, diese Zellen nach (während) der Zentrifugation durch mindestens einen kleinen Kanal in eine Dialysenkammer abströmen zu lassen. Hier werden alle gelösten Bestandteile durch eine Dialysemembran geleitet, deren Ausschlussgröße so beschaffen ist, dass lediglich Zellen zurückgehalten werden. Die Zellsuspension kann anschließend in einem Rest der Dialyselösung verbleiben, die aufgrund ihrer entsprechenden Zusammensetzung auch als Nähr- und Pufferlösung für die Zellen dient. Durch den Einbau einer zur Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Mess- und Zählkammer können die Zellen untersucht werden.

[0063] Des weiteren können gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung auch mehrere Kolloide X über die Linker-Moleküle zu größeren Clustern verknüpft werden. Diese Reaktion kann in Konkurrenz zur Anbindung des Wirkstoffes Z an das Kolloid X treten. Erfindungsgemäß kann das Verhältnis dieser beiden konkurrierenden Reaktionen durch geeignete Modifikation des verwendeten Verfahrens beeinflusst werden. Dies kann am einfachsten durch Veränderung des Verhältnisses der eingesetzten Reagenzien und Substrate sowie durch Modifikation des Molekulargewichtes des Kolloids erfolgen. Des weiteren beeinflussen auch Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Druck und Katalysatoren das Verhältnis der beiden Reaktionen. Durch Clusterbildung können vorteilhafte neue Blutplasmaersatzlösungen, beispielsweise auf Basis der Hydroxyethylstärke hergestellt werden.

[0064] Die erfindungsgemäßen, als Blutersatzstoff geeigneten Verbindungen entsprechen denjenigen der obengenannten Formel (I), in der X, L, M, m und n die obengenannten Bedeutungen haben, Z jedoch einer kolloidwirksamen Verbindung E entspricht. Diese Verbindungen entsprechen somit der allgemeinen Formel (Ia)



[0065] Der kolloidwirksame Rest/Verbindung E kann aus der oben für den kolloidwirksamen Rest/Verbindung X angegebenen Gruppe ausgewählt sein, wobei E un-

abhängig von X mit der Gruppe X identisch oder von ihr verschieden sein kann. Das mittlere Molekulargewicht der Verbindung der Formel Ia beträgt zwischen 80.000 und 750.000 Dalton, vorzugsweise bis 450.000 Dalton.

[0066] In einer Ausführungsform weist wenigstens eine der Gruppen X oder E ein mittleres Molekulargewicht von unterhalb der Ausschlussgrenze der Nieren auf, d. h. $M_w \leq 60.000$ Dalton.

[0067] In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist E eine Hydroxyethylstärke (HES), vorzugsweise eine Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke, mit einem mittleren Molekulargewicht von weniger als 60.000, vorzugsweise weniger als 40.000 und besonders bevorzugt von weniger als 20.000 mit einem Substitutionsgrad DS von $>0,4$, vorzugsweise $>0,5$ und besonders bevorzugt $>0,6$. In einer konkreteren Ausgestaltung ist E ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus HES, vorzugsweise einer Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke, mit einem mittleren Molekulargewicht $M_w < 60.000$ und einem DS von $>0,4$, vorzugsweise einem $M_w < 40.000$ und einem DS von $>0,5$, besonders bevorzugt einem $M_w < 20.000$ und einem DS von $>0,6$.

[0068] Für die Erfassung der Substitution durch Hydroxyethylgruppen gibt es zwei unterschiedlich definierte Substitutionsgrade. Der Substitutionsgrad MS (Molar Substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucoseeinheit. Er wird ermittelt aus der Gesamtanzahl der Hydroxyethylgruppen in einer Probe, beispielsweise nach Morgan durch Etherspaltung und anschließender quantitativer Bestimmung von Ethyliodid und Ethylen, die hierbei gebildet werden.

[0069] Hingegen ist der Substitutionsgrad DS (Degree of Substitution) definiert als der Anteil der substituierten Anhydroglucoseeinheiten aller Anhydroglucoseeinheiten. Ihn kann man bestimmen aus der gemessenen Menge der unsubstituierten Glucose nach Hydrolyse einer Probe. Aus diesen Definitionen ergibt sich, dass $MS > DS$. Für den Fall, dass nur Monosubstitution vorliegt, also jede substituierte Anhydroglucoseeinheit nur eine Hydroxyethylgruppe trägt ist $MS = DS$.

[0070] Bei Poly-O-2-Hydroxyethyl-substituierte Stärke handelt es sich um eine Stärke, welche an der Hydroxylgruppe in C-2-Position der Anhydroglucoseeinheit des Stärkemoleküls eine Hydroxyethylgruppe aufweist. Für weitere Einzelheiten zur physikalischen und chemischen Charakterisierung von Hydroxyethylstärke wird auf K. Sommermeyer et al. in Krankenhauspharmazie 1987 (8), Seiten 271 - 278 und die darin in Bezug genommene Literatur verwiesen.

[0071] Anstelle der obengenannten Hydroxyethylstärken können auch Dextrane mit einem mittleren Molekulargewicht von >5.000 als Gruppe E eingesetzt werden.

[0072] Unabhängig von der Gruppe E kann die Gruppe X ausgewählt sein aus der Gruppe der Hydroxyethylstärken, insbesondere der Poly(O-2-hydroxyethyl)stärken, mit einem mittleren Molekulargewicht M_w von

>20.000, >70.000 oder >150.000, der Substitutionsgrad DS beträgt dabei <0,4 und vorzugsweise <0,6. Als Gruppe X sind besonders solche HES, insbesondere Poly(O-2-hydroxyethyl)stärken, mit einem Mw >70.000 oder >150.000 und einem DS von <0,4 oder solche mit einem Mw von >20.000 und einem DS von <0,6 geeignet.

[0073] In einer besonderen Ausgestaltung ist sowohl die Gruppe X als auch die Gruppe E mit einem mittleren Molekulargewicht Mw von <50.000 und einem Substitutionsgrad DS <0,4, vorzugsweise einem Mw von <30.000 und einem DS <0,4. Ganz besonders bevorzugt für X und E sind mittlere Molekulargewichte der Hydroxyethylstärken von 5.000 bis 20.000 und 8.000 bis 12.000.

[0074] Das im Verhältnis zur Ausschlussgrenze der Nieren niedrigere Molekulargewicht wenigstens einer der kolloidwirksamen Verbindungen X und/oder E ermöglicht nach enzymatischer Spaltung der Verbindung $M_n-X-(L-E)_m$ am Linker eine relativ schnelle Elimination durch die Nieren.

[0075] Je kleiner das mittlere Molekulargewicht der nach Spaltung der Verbindung erhaltenen Einzelverbindungen E und X ist, um so schneller werden diese aus dem Körper nach wenigen Nierenpassagen eliminiert.

[0076] Die Herstellung der durch Kolloide modifizierten Kolloide erfolgt wie oben im Zusammenhang der einen Arzneimittelwirkstoff tragenden Kolloide beschrieben, nur dass in dieser Beschreibung die Gruppenbezeichnung "Z" (für den Wirkstoff) gegen "E" (für das einzuführende Kolloid) zu ersetzen ist. Die Erläuterungen für X und L gelten entsprechend. Es versteht sich von selbst, dass auch unterschiedliche kolloidal wirksame Gruppen $E_1 - E_z$ über einen Linkertyp L oder verschiedene Linker $L_1 - L_z$ mit gegebenenfalls unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten an das Primärkolloid X gebunden werden können.

[0077] Ferner ist es durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen eine Kombination von den obengenannten Arzneiwirkstoffen Z und den obengenannten Seitenkettenkolloiden E an das Primärkolloid X über Linker zu binden, was zu Molekülen der allgemeinen Formel



führt, wobei M, X, Z, E, n und m die obengenannten Bedeutungen haben und $y \leq m$ ist (n, m und y sind ganze, positive Zahlen) mit der Einschränkung, dass $Z \neq E$ ist.

[0078] Bei bisherigen Hydroxyethylstärkelösungen behindert eine relativ hohe molare Substitution den enzymatischen Abbau großer Teile des Makromoleküls, die dann entsprechend gespeichert werden.

[0079] Im Gegensatz zur herkömmlichen Hydroxyethylstärke wird die über Linker verbundene Verbund-Hydroxyethylstärke beim Nierengesunden fast vollständig aus dem Körper eliminiert. Anders ausgedrückt, durch

die Synthese von Makromolekülen unter Bildung von Linkern werden definierte Sollbruchstellen in das Makromolekül eingeführt, die die Elimination verbessern. Die Synthese dieser Verbindungen wird vereinfacht, da alle Bestandteile des Verbund-Kolloids genau einem polydispersen Kolloidgemisch entstammen wobei eine Mehrzahl von kleineren Elementen zu Makromolekülen unter Bildung des Linkers L reagieren, bzw. polymerisieren.

[0080] Dementsprechend betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen, insbesondere wässrige Zusammensetzungen enthaltend die Verbindung $M_n-X-(L-E)_m$ in einer Konzentration von 1 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 20 Gew.-% bezogen auf die Gesamtzusammensetzung. Vorzugsweise können diese Zusammensetzungen als Blutplasmaersatzmittel verwendet werden, die bedingt durch deren Aufbau, steuerbar spaltbar sind. Hierzu enthalten diese Zusammensetzungen einen Kationenanteil von 100 - 170 mmol/l und einen Anionenanteil von 100 - 170 mmol/l mit einer Osmolalität von 200 bis 500 mOsmol/l, vorzugsweise von 300 bis 400 mOsmol/l. Teile des Kationen- und Anionenanteils können durch einen Zucker, Glucose und/oder ein Polyol ersetzt werden. Die Blutplasmaersatzmittel werden durch Infusion verabreicht.

[0081] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

30 Beispiele

Beispiel 1

[0082] 1 Mol Abbaustärke und 15 Mol Digoxin wurden durch Zugabe von NaOH auf einen pH von 8 bis 9 eingestellt. Unter intensivem Rühren wurden 25 Mol Malonsäuredichlorid langsam zuge tropft. Nach wässriger Aufarbeitung wurden die Reaktionsprodukte durch Ultrafiltration (Membran 50.000 Dalton) von niedermolekularen Bestandteilen befreit und schließlich gefriergetrocknet.

Beispiel 2

[0083] 1 Mol einer Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Substitutionsgrad DS von 0,3 und einem Molekulargewicht von 300.000 und 23 Mol einer Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Substitutionsgrad DS von 0,6 und einem Molekulargewicht von 20.000 wurden unter Zugabe von NaOH auf einen pH von 8 bis 9 eingestellt. Unter intensivem Rühren wurden 25 Mol Malonsäuredichlorid langsam zuge tropft. Nach wässriger Aufarbeitung wurden die Reaktionsprodukte durch Ultrafiltration (Membran 50.000 Dalton) von niedermolekularen Bestandteilen befreit und schließlich gefriergetrocknet.

Beispiel 3

[0084] 15 Mol einer Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Substitutionsgrad DS von 0,8 und einem Molekulargewicht von 15.000 wurden unter Zugabe von NaOH auf einen pH von 8 bis 9 eingestellt. Unter intensivem Rühren wurden 25 Mol Malonsäuredichlorid langsam zugetropft. Nach wässriger Aufarbeitung wurden die Reaktionsprodukte durch Ultrafiltration (Membran 75.000 Dalton) von niedermolekularen Bestandteilen befreit und schließlich gefriergetrocknet.

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel I



wobei

- X eine kolloidwirksame Verbindung,
 - Z ein Arzneimittelwirkstoff,
 - L einen Linker, durch den X mit Z kovalent verknüpft ist,
 - M ein Fluoreszenzmarker,
 - m eine ganze Zahl zwischen 1 und 10.000 ist und
 - n 0 oder 1 ist.
2. Verbindung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L eine funktionelle Gruppe, ausgewählt aus Carbonsäureestern, Carbonsäureamiden und Urethanen ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Reaktion eines Diamins der allgemeinen Formel II

wobei R^1 ausgewählt ist aus

- einer Einfachbindung
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit bis 22 Kohlenstoffatomen;

- Aryl-, Aryl- C_1-C_4 -Alkyl- und Aryl- C_2-C_6 -Alkenylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C_1-C_6 -Alkyl- und/oder C_2-C_6 -Alkoxygruppen; oder
- Heteroaryl-, Heteroaryl- C_1-C_4 -Alkyl- und Heteroaryl- C_2-C_6 -Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C_1-C_6 -Alkyl- und/oder C_2-C_6 -Alkoxygruppen,

mit einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, die jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus

- Carboxyl- ($-COOH$),
- Carbonsäurehalogenid- ($-CO-A$, mit $A = Cl, Br$ oder I)
- Carboxylalkylen- ($-(CH_2)_q-COOH$, mit $q = 1-10$) oder Ester-Gruppen ($-COOR$),

unter Bildung des Linkers L.

4. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Reaktion eines Diols der allgemeinen Formel III

wobei R^1 ausgewählt ist aus

- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen;
- Aryl-, Aryl- C_1-C_4 -Alkyl- und Aryl- C_2-C_6 -Alkenylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C_1-C_6 -Alkyl- und/oder C_2-C_6 -Alkoxygruppen; oder
- Heteroaryl-, Heteroaryl- C_1-C_4 -Alkyl- und Heteroaryl- C_2-C_6 -Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C_1-C_6 -Alkyl- und/oder C_2-C_6 -Alkoxygruppen,

mit einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, die jeweils unabhängig voneinander

ander ausgewählt sind aus

- Carboxyl- (-COOH),
- Carbonsäurehalogenid- (-CO-A, mit A = Cl, Br oder I) 5
- Carboxylalkylen- (-CH₂)_q-COOH, mit q = 1-10)
- Isocyanat- (-NCO) 10
- oder Ester-Gruppen (-COOR),

unter Bildung des Linkers L. 15

5. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Reaktion einer Dicarbonsäure der allgemeinen Formel IV



wobei R¹ ausgewählt ist aus

- einer Einfachbindung 25
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen; 30
- Aryl-, Aryl-C₁-C₄-Alkyl- und Aryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen; oder 35
- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₄-Alkyl- und Heteroaryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen, 40

mit jeweils einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, die jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus 45

- Amino- (-NH₂),
- oder Hydroxyl-Gruppen (-OH),

unter Bildung des Linkers L. 50

6. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Re-

aktion eines Dicarbonsäurehalogenids der allgemeinen Formel V



wobei A = Cl, Br oder I und R¹ ausgewählt ist aus

- einer Einfachbindung;
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₄-Alkyl- und Aryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen; oder
- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₄-Alkyl- und Heteroaryl-C₂-C₆-Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl- und/oder C₂-C₆-Alkoxygruppen,

mit einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, die jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus

- Amino- (-NH₂),
- oder Hydroxyl-Gruppen (-OH),

unter Bildung des Linkers L.

7. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Reaktion einer Diesters der allgemeinen Formel VI



wobei R' eine C₁₋₁₀-Alkylgruppe ist und R¹ ausgewählt ist aus

- einer Einfachbindung;
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₄-Alkyl- und Aryl-C₂-C₆-Alke-

nylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C₁-C₈-Alkyl- und/oder C₂-C₈-Alkoxygruppen; oder

- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₄-Alkyl- und Heteroaryl-C₂-C₈-Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C₁-C₈-Alkyl- und/oder C₂-C₈-Alkoxygruppen,

mit jeweils einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, die jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus

- Amino- (-NH₂),
- oder Hydroxyl-Gruppen (-OH),

unter Bildung des Linkers L.

8. Verbindung nach Anspruch 1, erhältlich durch Reaktion eines Diisocyanats der allgemeinen Formel VII



wobei R¹ ausgewählt ist aus

- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Kohlenwasserstoffresten mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₄-Alkyl- und Aryl-C₂-C₈-Alkenylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls substituiert sein können mit C₁-C₈-Alkyl- und/oder C₂-C₈-Alkoxygruppen; oder
- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₄-Alkyl- und Heteroaryl-C₂-C₈-Alkenylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroarylrest und einem oder zwei Heteroatom(en) ausgewählt aus N, O und S, die substituiert sein können mit C₁-C₈-Alkyl- und/oder C₂-C₈-Alkoxygruppen,

mit einer freien Hydroxyl-Gruppe (-OH) des zugrundeliegenden Arzneimittelwirkstoffes Z und wenigstens einer freien funktionellen Gruppe des zugrundeliegenden Kolloids X, unter Bildung des Linkers L

9. Pharmazeutische wässrige Zusammensetzung umfassend die Verbindung M_n-X-(L-Z)_m nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8.

- 5 10. Kit-of-parts umfassend räumlich getrennt voneinander die pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9 sowie ein zur Zentrifugation geeignetes Gefäß.

- 10 11. Zellsuspension umfassend Zellen des Blutes, enthaltend die Verbindung M_n-X-(L-Z)_m, nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8.

- 15 12. Verfahren zur Herstellung der Zellsuspension wie in Anspruch 11 definiert durch

a. (ex-vivo) Inkubation von menschlichem oder tierischem Blut mit einer Verbindung M_n-X-(L-Z)_m, durch Vermischen der wässrigen Zusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 19 bis 20 definiert, mit dem Blut,

b. Abtrennung der inkubierten Blutzellen von der wässrigen Zusammensetzung, gemäß Ansprüchen 19 bis 20, durch Zentrifugation,

c. Befreiung der separierten inkubierten Blutzellen von nicht aufgenommener Verbindung M_n-X-(L-Z)_m durch Dialyse,

d. Isolierung der Zellsuspension, umfassend die inkubierten Blutzellen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die inkubierten Blutzellen Leukozyten sind.

14. Verfahren zur Herstellung der Zellsuspension wie in Anspruch 11 definiert, dadurch gekennzeichnet, dass eine Quantifizierung und/oder Selektierung der phagocytierten Verbindung M_n-X-(L-Z)_m für n = 1 mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie erfolgt.

15. Verwendung der Zellsuspension nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Aufnahme eines Wirkstoffes Z in spezifische Organe des menschlichen oder tierischen Körpers.

- 50 16. Verbindung der allgemeinen Formel Ia



wobei

- X und E unabhängig voneinander identisch

oder voneinander verschieden sein können und sich ableiten aus der Gruppe bestehend aus kolloidwirksamen Verbindungen,

- L einen Linker, durch den X mit E kovalent verknüpft ist, 5
 - M ein Fluoreszenzmarker,
 - m eine ganze Zahl zwischen 1 und 10.000 ist und 10
 - n 0 oder 1 ist.
17. Verbindung gemäß Anspruch 16 mit einem mittleren Molekulargewicht Mw von 80.000 bis 750.000 Dalton. 15
18. Verbindung gemäß Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der Gruppen X und E ein mittleres Molekulargewicht von ≤ 60.000 Dalton aufweist. 20
19. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppe E ableitet aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw <60.000 und einem Substitutionsgrad DS $>0,4$. 25
20. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppe E ableitet aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw <40.000 und einem Substitutionsgrad DS $>0,5$. 30
21. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppe E ableitet aus der Gruppe bestehend aus PolyO-2-hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw <20.000 und einem Substitutionsgrad DS $>0,6$. 35
22. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppe E ableitet aus der Gruppe bestehend aus Dextranen mit einem Molekulargewicht Mw <5.000 und kovalent unter Bildung eines Linkers L mit kolloidwirksamen Molekülen verbunden sind, die sich aus der Gruppe ableiten bestehend aus Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw >70.000 und einem Substitutionsgrad DS $<0,4$. 40
23. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppe X ableitet aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw >20.000 und einem Substitutionsgrad DS $<0,8$. 45
24. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, dass sich die Gruppe E ableitet aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw >150.000 und einem Substitutionsgrad DS $<0,4$.

25. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppen E und X ableiten aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw <50.000 und einem Substitutionsgrad DS $<0,4$.
26. Verbindung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gruppen E und X ableiten aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht Mw <30.000 und einem Substitutionsgrad DS $<0,4$.
27. Verbindung nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke Poly(2-O-hydroxyethyl)stärke mit dem jeweils angegebenen mittleren Molekulargewicht und Substitutionsgrad ist.
28. Pharmazeutische wässrige Zusammensetzung umfassend die Verbindung der Formel Ia wie in irgendeinem der Ansprüche 16 bis 27 definiert.
29. Blutplasmaersatzstoff umfassend die Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 16 bis 27 in wässriger Lösung.